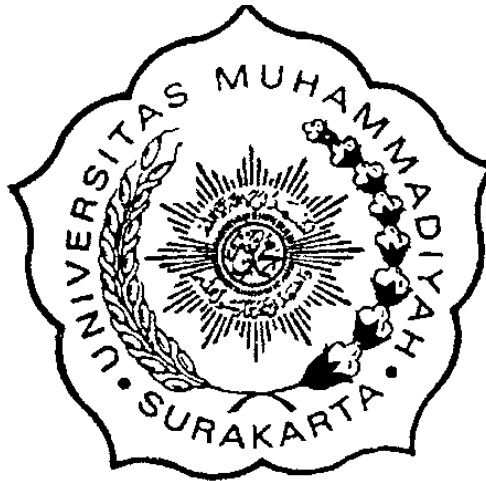


**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK KLOROFORM KULIT
BATANG KRANGEAN (*Litsea cubeba* Pers.) TERHADAP
SEL KANKER MCF-7 dan T47D**



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada
Program**

Fakultas Farmasi

Oleh:

SANATI

K100120121

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA

2018

HALAMAN PERSETUJUAN

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK KLOOROFORM KULIT BATANG
KRANGEAN (*Litsea cubeba* Pers.) TERHADAP
SEL KANKER MCF-7 dan T47D**

PUBLIKASI ILMIAH

oleh:

SANATI

K100120121

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing

Azis Saifudin, Ph.D., Apt.

NIK.956

HALAMAN PENGESAHAN

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK KLOROFORM KULIT BATANG
KRANGEAN (*Litsea cubeba* Pers.) TERHADAP
SEL KANKER MCF-7 dan T47D**

OLEH

SANATI

K100120121

**Telah dipertahankan didepan Dewan Penguji
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada hari Rabu, 23 Mei 2018
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat**

Dewan Penguji:

- 1. Dr. HARYOTO, M.Sc.**
(Ketua Dewan Penguji)
- 2. MARYATI, Ph.D., Apt**
(Anggota I Dewan Penguji)
- 3. AZIS SAIFUDIN, Ph.D., Apt.**
(Anggota II Dewan Penguji)


(.....)


(.....)


(.....)

Dekan,



Azis Saifudin, Ph.D., Apt

NIK. 956

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 23 mei 2018

Penulis



SANATI

K100121012

**UJI SITOTOKSIK EKSTRAK KLOROFORM KULIT BATANG
KRANGEAN (*Litsea cubeba* Pers.) TERHADAP SEL KANKER
MCF-7 dan T47D**

Abstrak

Kematian akibat kanker pada wanita didominasi oleh kanker payudara dengan persentase sekitar 21,4%. Kulit batang kragean merupakan salah satu tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai obat anti kanker. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak kulit batang kragean terhadap sel MCF-7 dan T47D. Kulit batang kragean diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut kloroform. Uji sitotoksik dibuat 5 seri konsentrasi (25, 50, 100, 200, 400 µg/mL) dan aktivitas sitotoksik diuji dengan metode MTT. Uji KLT dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa pada ekstrak kloroform kulit batang kragean. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform kulit batang kragean mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D dengan nilai IC_{50} 99,98 µg/mL dan pada sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} 42,92 µg/mL. Hasil uji KLT menunjukan bahwa ekstrak kloroform kulit batang kragean mengandung flavanoid, anisaldehyd dan terpenoid.

Kata Kunci: Sitotoksik, kragean, MCF-7 dan T47D.

Abstract

Mortality caused by cancer for women is dominated by breast cancer with presentation of 21,4%. Litsea cubeba is one of the plant that have the potential to be developed as an anti-cancer drug. The research was done to find out IC_{50} extract value of crude litsea cubeba against MCF-7 dan T47D cells. Litsea cubeba a were extracted by maceration metode using chloform solvent. A cytotoxic test was made 5 series of concentrations of (25, 50, 100, 200, 400 µg/mL) and cytotoxicactivity was test using MTT method. KLT method was performed to determine the compound content of chloroform extract of kragean stem bark. The result of the study showed that chloroform extract of litsea cubeba had cytotoxic activity on cell T47D with score IC_{50} 99,98 µg/mL and cell MCF-7 the score was IC_{50} 42,92 µg/mL and compound of chloform extract litsea cubeba done. KLT test results showed that chloroform extract of kragean bark contains flavanoid, anisaldehyd and terpenoid.

Keywords: Cytotoxic, kragean, MCF-7 and T47D

1. PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu penyakit yang paling mengkhawatirkan dalam beberapa dekade ini. Kanker dapat terjadi karena adanya beberapa faktor, antara lain: lingkungan, alkohol, infeksi kronis, paparan radiasi, dan perubahan gaya hidup. Kanker merupakan jenis penyakit yang menyebabkan sel-sel dalam tubuh berubah atau tumbuh diluar kendali. Sel kanker yang berbentuk tonjolan (America Cancer Society, 2016). Kanker payudara termasuk jenis kanker yang sering terjadi pada wanita. Dari semua kasus kanker pada wanita di Amerika Serikat, kanker payudara menduduki peringkat pertama (32%) dan kematian akibat kanker payudara mencapai (18%). Kanker payudara (*Carcinoma mammae*) merupakan penyakit dengan kematian angka tertinggi. Umumnya terjadi karena kurangnya kesadaran atau terlambatnya dalam pengobatan sehingga untuk ditangani ketahap selanjutnya itu sangat sulit (Amir *et al.*, 2017). Di Indonesia, penyebab kematian akibat kanker pada wanita didominasi oleh kanker payudara dengan persentasi sekitar 21,4% (WHO, 2014). Lebih dari 30 % dari kematian akibat kanker yang disebabkan oleh lima faktor risiko perilaku dan pola makan, diantaranya (1) indeks massa tubuh tinggi (2) kurang konsumsi buah dan sayur (3) kurang aktivitas fisik (4) merokok dan (5) konsumsi alkohol berlebih (Kemenkes RI, 2015)

Tanaman kragean (*Litsea cubeba* Pers.) diketahui memiliki manfaat dalam pengobatan kanker seperti kanker payudara dan kanker paru-paru. Tanaman ini juga terbukti bioaktivitasnya sebagai antikanker, antiinflamasi, antibiotik, dan antioksidan (Piyapat, 2014). Tanaman kragean (kilimo) telah banyak dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antiinflamsi, antifungi, antioksidan, dan sebagai sitotoksik. (Ho *et al.*, 2010) mengungkapkan bahwa *Litsea cubeba* Pers (Kragean) menghasilkan minyak atsiri yang memiliki banyak kandungan senyawa untuk menguji sebagai antikanker. Minyak atsiri diketahui memiliki aktivitas sebagai antikanker serta dapat meningkatkan kualitas hidup pasien kanker. Tanaman kragean banyak digunakan sebagai pengobatan tradisional China dikarenakan

memiliki manfaat diantaranya untuk pengobatan asma, gangguan pencernaan, antiseptik, obat kejang urat, dan antibakteri (Rahayu *et al.*, 2015).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Xiangchun (2013), menunjukan bahwa tanaman kragean memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} sebesar 75 $\mu\text{g/ml}$. Selain itu penelitian Zhang *et al.* (2012) mengemukakan sel MCF-7 nilai IC_{50} antara 10.34 -11.86 μM . Menurut Dalimunthe *et al.* (2017), ekstrak buah *Litsea cubeba* Pers dapat menghambat kanker T47D nilai IC_{50} secara berturut-turut sebesar 67.52 ± 2.45 , 75.59 ± 3.24 , dan 63.70 ± 2 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek sitotoksik ekstrak kloroform kulit batang kragean (*Litsea cubeba* Pers.) terhadap sel kanker MCF-7 dan T47D dan nilai IC_{50} .

2. METODE

2.1 ALAT

Mikropipet, propipet, pipet volume (Pyrex), kertas saring, benjana KL, lampu UV 254 nm dan UV 366 nm. Alat yang digunakan uji sitotoksik yaitu mikroplate 96 sumuran (iwaki), *culture microscope* (Olympus, tipe CKX41), incubator (binder, tipe inkubator CO2), *absorbance microplate reader* (Biotek, tipe Elx800), *haemocytometer* (assistent), *cytotoxic safety cabinet* (Esco, tipe cytoculture), tabung sentrifugasi 1,5 ml (Ependorf, Handtally counter (Kenko, model HT-302), oven (Memmert), *Waterbath* (mamaers), Sonikator (Branson), mikropipet (Socorex), timbangan elektrik (Precisa, tipe XT120A), pipet ukur 5 dan 10 mL (Pyrex), aluminium foil, dan kamera digital.

2.2 Bahan

Kulit batang kragean, kloroform, sel MCF-7, sel T47D MTT dalam FBS (*Fetal Bovine Serum*) 5 mg/mL, SDS 10% dalam 0,01% N HCl, media kultur DMEM, NaHCO_3 , DMSO, penisilin-streptomisin 1%, DMSO 100% prokultur, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 10% (Sigma) dalam HCl 0,01 N (Merck). Silika gel GF₂₅₄, n-hexane, aseton, reagen semprot dragondroff, reagen sitroborat, dan anisaldehyd

2.3 Ekstraksi kulit batang kranglean

Kulit batang kranglean sebanyak 250 gram dicampur dengan kloroform 1,75 liter dimasukkan dalam benjana (wadah kaca) kemudian dimaserasi selama 6 hari. Ekstrak disaring dalam bentuk cair selanjutnya akan dilakukan pengentalan dengan menggunakan *rotary evaporator* 50°C. Selanjutnya ekstrak diuapkan dengan *waterbath* sampai memperoleh ekstrak kental

2.4 Uji Kandungan Senyawa

Uji kandungan senyawa dengan metode KLT (kromatografi lapis tipis) dengan menggunakan silika GF₂₅₄. dan fase geraknya n-hexana: aseton (6:4), dijenuhkan di benjana (*chamber*) terlebih dahulu selanjutnya sampel ditotolkan pada silika kemudian dimasukan ke *chamber* ditunggu hingga terelusi sampai batas yang sudah ditentukan. Plat KLT disemprotkan dengan reagen sitroborat, anisaldehyd.

2.5 Uji Sitotoksik

Uji Sitotoksik dilakukan menggunakan metode MTT, sel dengan kepadatan 5×10^4 tiap sumuran sebanyak 100 µL dimasukan kedalam *96-well plate*. tahap, selanjutnya diinkubasi dengan inkubator CO₂ selama 24 jam. Sel diamati di bawah mikroskop setelah sel konfluen ditambahkan sampel dengan ekstrak, media kultur yang digunakan untuk sel MCF-7 DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) dan sel T47D RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ selama 48 jam. Sel diberi perlakuan ekstrak uji dengan konsentrasi (25; 50; 100; 200 dan 400 µg/mL) selanjutnya diinkubasi selama 24 jam media dibuang, ditambahkan 100 µL larutan MTT ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 2-4 jam diinkubator CO₂ pada suhu 37°C (sampai terbentuk formazan). Formazan telah terbentuk, maka ditambahkan stopper SDS 10% dalam 0,1% HCl. Jika sel hidup akan bereaksi pada MTT dan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Kemudian bungkus plate dengan kertas atau aluminium foil dan diinkubasi ditempat gelap (suhu ruangan) semalaman (jangan letakan diinkubator) lalu hidupkan ELISA reader, tunggu progressing hingga selesai. Selanjutnya buka bungkus dan penutup plate. Dibaca absorbansi dengan ELISA dengan $\lambda=550-600$

dan didapat data sampel. Hitung presentasi sel hidup dari data absorbansi sel, lalu dibuat kurva hubungan antara log konsentrasi versus % sel hidup dan dihitung IC_{50} (CCRC, 2009).

Jika absorbansi kontrol pelarut sama dengan kontrol sel maka hitung prosentase sel hidup dengan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol}}{\text{absorbansi kontrol sel} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\% \quad (1)$$

Jika absorbansi kontrol pelarut lebih rendah dari absorbansi kontrol sel maka hitung prosentase sel hidup dengan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{absorbansi perlakuan} - \text{absorbansi kontrol}}{\text{absorbansi kontrol pelarut} - \text{absorbansi kontrol media}} \times 100\% \quad (2) \quad (\text{CCRC, 2009})$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

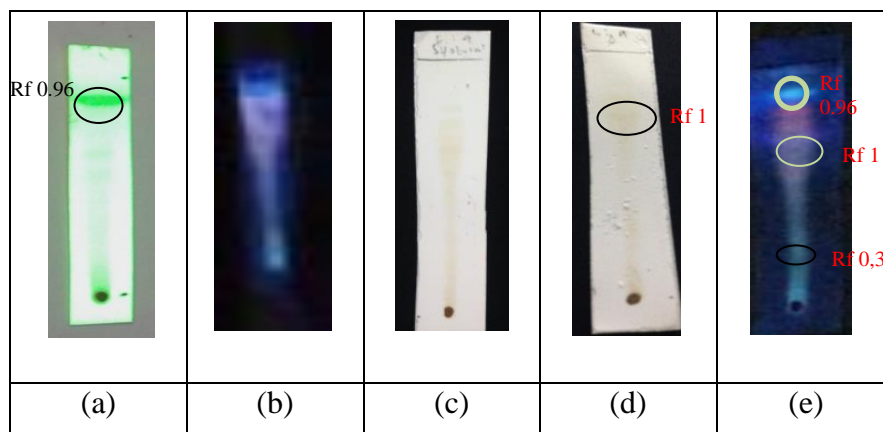
3.1 Ekstraksi kulit batang krangan

Ekstrak 250 gram kulit batang krangan dihasilkan rendemen 38,94%.

3.2 Analisis kandungan senyawa sampel

Hasil KLT (Gambar 1) menunjukkan bahwa ekstrak kloroform kulit batang krangan mengandung golongan senyawa flavanoid dengan ditandai adanya warna biru setelah disemprot reagen sitroborat dan golongan senyawa terpenoid dengan adanya bercak berwarna kuning coklat setelah disemprotkan dengan reagen anisaldehyd.

Pereaksi reagen semprot sitroborat untuk deteksi flavonoid, reagen anisaldehyd untuk deteksi senyawa terpenoid. Reaksi positif adanya flavonoid ditunjukkan dengan adanya bercak kuning, kuning kehijauan atau kuning kemerahan di bawah sinar UV 366 nm dengan reagen semprot sitroborat (Markham, 1982). Sedangkan menurut Wagner, 1984 flavanoid akan menunjukan bercak pada pemadaman UV 254 nm sedangkan UV 366 nm bercak akan berwarna kuning gelap, hijau atau biru. Menggunakan reagen semprot anisaldehyda akan menghasilkan senyawa warna-warna ungu, kuning coklat, dan hitam pada sinar tampak dan akan menghasilkan senyawa terpenoid (Saifudin, 2014).



Gambar 1. Hasil KLT ekstrak kloroform kulit batang krangean dengan fase gerak n-hexana:aseton (6:4) dan fase diam silika gel GF254

Keterangan :

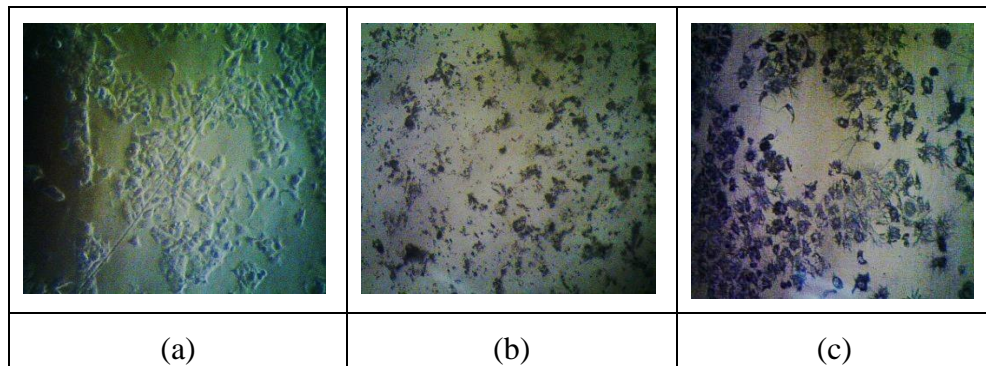
- (a) **Deteksi UV 254 nm**
- (b) **Deteksi UV 366 nm**
- (c) **Deteksi reagen semprot sitroborat pada sinar tampak**
- (d) **Deteksi reagen semprot anisaldehyd pada sinar tampak**
- (e) **Deteksi reagen semprot sitroborat pada UV 366 nm**

3.3 Uji Sitotoksik

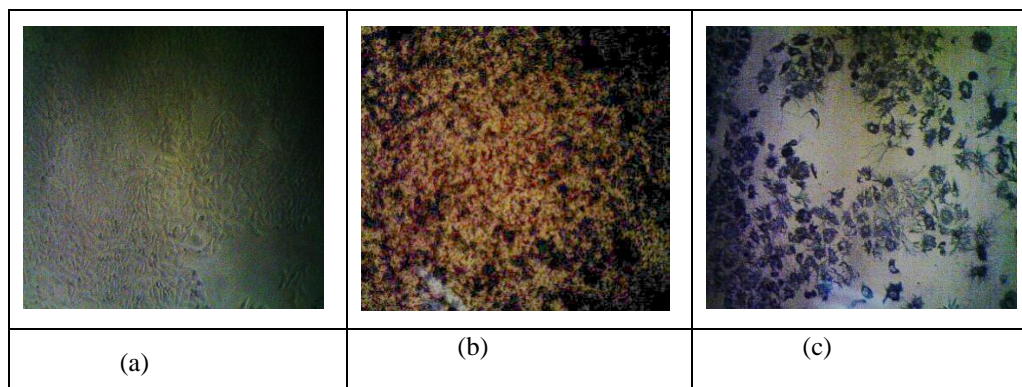
Uji sitotoksik pada sel MCF-7 dan T47D dilakukan dengan metode MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid). Prinsip kerja dari MTT terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase (CCRC, 2009).

Sel MCF-7 terlihat dibawah mikroskop sebelum diberi perlakuan memiliki morfologi bentuknya bulat atau oval dan tidak berwarna pada inti atau tengah bagian sel (Gambar 2a). Selanjutnya pada (Gambar 2b) sel yang telah diberi perlakuan dengan konsentrasi tertinggi 400 µg/mL menunjukkan adanya kematian ditandai dengan perubahan warna kehitaman pada bagian tengah sel. Pada uji sitotoksik ekstrak kulit batang krangean memberikan hasil berupa penurunan sel hidup seiring dengan peningkatan kadar konsentrasi dan hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak kloroform kulit batang krangean mempunyai aktivitas sitotoksik

terhadap sel MCF-7 42,92 $\mu\text{g/mL}$. Sel MCF-7 yang telah diberi reagen MTT (Gambar 2c) sel yang masih hidup akan membentuk kristal ungu.



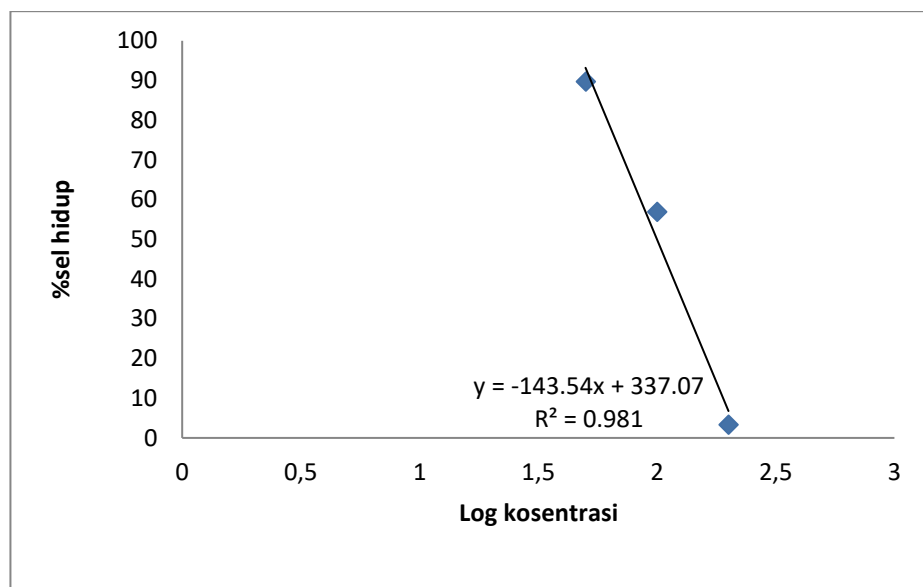
Gambar 2.Morfologi sel MCF-7:(a) sel konfluens 80 % sebelum diberi perlakuan(b) sel yang telah diberi perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 400 μL (c) sel yang diberi reagen MTT



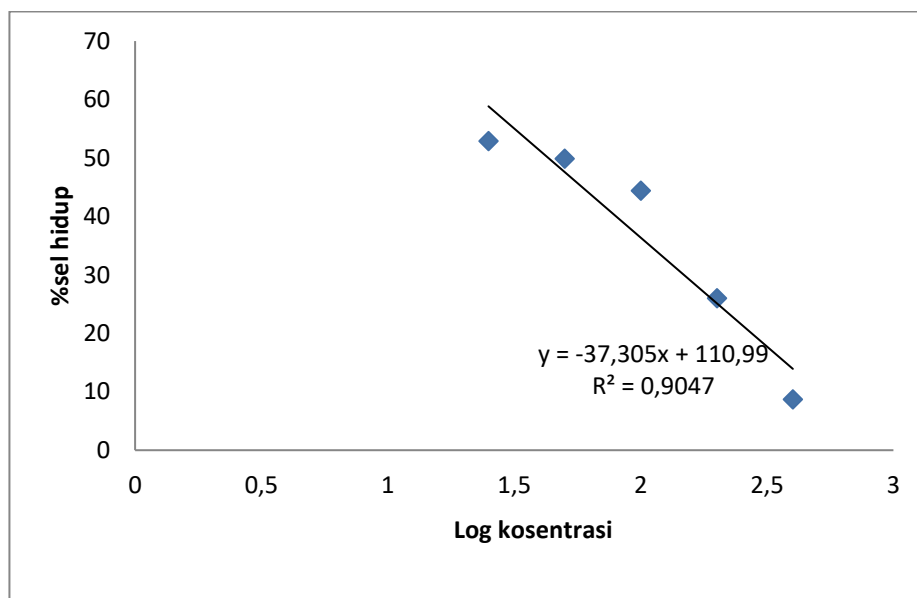
Gambar 3.Morfologi sel T47D: (a) sel konfluens 80% yang belum diberi perlakuan (b) sel yang telah diberi perlakuan ekstrak dengan konsentrasi 400 μL (c) sel yang telah di beri MTT

(Gambar 3a) menunjukkan morfologi sel T47D yang berbentuk lonjong.Pada (Gambar 3b) menunjukkan adanya kematian sel setelah diberi perlakuan ekstrak kloroform kulit batang krangan konsentrasi tertinggi 400 $\mu\text{g/mL}$. Ditandai dengan warna sel yang menghitam. Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak ekstrak kloroform kulit batang krangan mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D 99,98 $\mu\text{g/mL}$. Sel T47D yang telah diberi reagen MTT (Gambar 2c) sel yang masih hidup akan membentuk kristal ungu.

Hasil uji sitotoksik diperoleh dari pembacaan plate pada ELISA reader dengan panjang gelombang 550 nm. Hasil menunjukkan bahwa adanya hubungan yang berbanding terbalik terhadap konsentrasi ekstrak dengan persen sel hidup, menunjukkan semakin besar konsentrasi maka semakin kecil persen sel hidup (Gambar 4, Gambar 5).



Gambar 4. Pengaruh ekstrak kloroform kulit batang kragean (*Litsea cibeiba* Pers.) terhadap sel T47D



Gambar 5. Pengaruh ekstrak kloroform kulit batang kragean (*Litsea cubeba* Pers.) terhadap sel MCF-7

Hasil uji menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak kloroform kulit batang kragean terhadap sel T47D adalah 99,98 $\mu\text{g/mL}$ dan untuk sel MCF-7 42,92 $\mu\text{g/mL}$. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hasil IC_{50} dari sel MCF-7 dan sel T47D dapat dimasukkan dalam kategori poten. Menurut (Balantyne *et al.*, 1999) senyawa dikatakan poten apabila nilai $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, aktivitas sitotoksik moderat jika memiliki nilai $IC_{50} > 100 - < 1000 \mu\text{g/mL}$, dan tidak mempunyai aktivitas sitotoksik jika nilai $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. Efek dari kulit batang tergolong sitotoksik potensial terhadap pertumbuhan sel kanker dan hasil dari persentasi menunjukkan adanya menghambat pertumbuhan sel kanker.

4. PENUTUP

Ekstrak kloroform kulit batang kragean mempunyai aktivitas sitotoksik pada sel T47D dengan nilai 99,98 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan pada sel MCF-7 dengan nilai 42,92 $\mu\text{g/mL}$.

Hasil KLT menunjukkan adanya kandungan senyawa pada ekstrak kloroform kulit batang kragean mengandung senyawa flavonoid, anisaldehyd dan terpenoid.

PERSANTUNAN

Naskah publikasi ini, penulis persembahkan kepada kedua orangtuaku tercinta atas doadan dukungan moril maupun materil yang tiada tara. Saudara-saudarku tersayang atas dukungan, doa dan semangatnya serta sahabat-sahabatku semuanya tanpa kecuali, terima kasih atas motivasi, dukungan dan doanya selama ini.

DAFTAR PUSTAKA

- America Cancer Society, 2016. Breast Cancer 2015-2016. *Breast Cancer Facts & Figures*.
- Amir, H. *et al.*, 2017. Uji Microtetrazolium (MTT) Ektrak Metanol Daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Terhadap Sel Kanker Payudara MCF- 7, 1(1), hal.27–32.
- Balantyne, T. M. and T S., 1999, *General and applied toxicology*, USA.
- CCRC, 2009. *In vitro Cancer Chemoprevention Research Center.*, hal.1–23.
- Dalimunthe, A., Hasibuan, P.A.Z. & Satria, D., 2017. *Cell Cycle Arrest Activity Of Litsea cubeba Lour : Heartwood and Fruit Extracts Against T47D Breast Cancer Cells.*, 10(11), hal.24–26.
- Gautam, N., Mantha, A.K. & Mittal, S., 2014. *Essential Oils and Their Constituents as Anticancer Agents : A Mechanistic View.*, 2014, hal.23.
- Ho, C. *et al.*, 2010. *Compositions and in vitro Anticancer activities of the Leaf and Fruit Oils of Litsea cubeba from Taiwan*, 5, hal.8–11.
- Kesehatan Kementerian, R., 2015. Stop Kanker.Pusat data dan Informasi. Jakarta.
- Markham, K. R., (1982), Cara Mengidentifikasi Flavanoid, Bandung: Penerbit ITB, 1
- Piyapat, T., 2014. Studies on Bioactive Compounds Found in Litsea cubeba Fruits. *Studies on Bioactive Compound*:<http://iyokan.lib.ehime-u.ac.jp/dspace/handle/iyokan/4352>.
- Rahayu, M.P. *et al.*, 2015. Aktivitas Antibakteri dan Antijamur Kulit Batang Krangan(*Litsea cubeba*Pers.),12(2).<http://farmasiindonesia.setiabudi.ac.id/>.
- Rohyami, Y., 2008. Penentuan Kandungan Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* Scheff Boerl). 5(Jurnal Penelitian & Pengabdian uii.ac.id), hal.1–16.
- Saifudin, A., 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*. Deepublish., Sleman.
- Wagner, H., dan Bladt, S., Zgainski E.M., Plant Drug Analysis "A Thin Layer Chromatography Atlas". Berlin Heidelberg New York Tokyo. 1984. hal 28-9.
- World Health Organization.(2014). *World Cancer Day 2012*.
- Xiangchun, X., 2013. *Proteomic Analysis of Litsea cubeba (Lour.) Pers. Extracts Treated MCF-7 Cell*, hal.6–7.

Zhang W. *et al.*, 2012. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Isoquinoline Alkaloids from *Litsea Cubeba*. Molecule ISSN 1420-3049
www.mdpi.com/journal/molecules

